



PATENT  
1686-0108P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Yoko MOTODA et al. Conf.: Unknown  
Appl. No.: 10/748,055 Group: Unknown  
Filed: December 31, 2003 Examiner: UNKNOWN  
For: PROCESS FOR PRODUCING TEMPLATE DNA AND  
PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN IN CELL-  
FREE PROTEIN SYNTHESIS SYSTEM WITH THE  
USE OF THE SAME

L E T T E R

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

February 10, 2004

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

| <u>Country</u> | <u>Application No.</u> | <u>Filed</u> |
|----------------|------------------------|--------------|
| JAPAN          | 2001-201356            | July 2, 2001 |

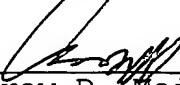
A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By

  
Andrew D. Meikle, #32,868

P.O. Box 747  
Falls Church, VA 22040-0747  
(703) 205-8000

ADM:gmh  
1686-0108P

Attachment(s)

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

YOKO MOTODA et al.  
10/748,055  
Dec. 31, 2003  
1086-0108P  
Birch, Stewart, Kolasch +  
Birch, LLP  
703/205-8000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日      2001年 7月 2日  
Date of Application:

出願番号      特願 2001-201356  
Application Number:

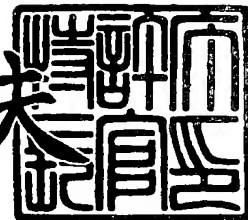
[ST. 10/C] :      [JP 2001-201356]

出願人      理化学研究所  
Applicant(s):

2004年 1月 23日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【提出日】 平成13年 7月 2日

【整理番号】 RJH13-021T

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 21/02

C12P 19/34

C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 理化学  
研究所 横浜研究所内

【氏名】 元田 容子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 理化学  
研究所 横浜研究所内

【氏名】 矢吹 孝

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 理化学  
研究所 横浜研究所内

【氏名】 木川 隆則

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 理化学  
研究所 横浜研究所内

【氏名】 横山 茂之

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

**【代理人】**

【識別番号】 100080816

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 加藤 朝道

**【手数料の表示】**

【予納台帳番号】 030362

【納付金額】 21,000円

**【提出物件の目録】**

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 鑄型DNAの製造方法及びそれを用いた無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質又はその一部をコードする配列を含む第1の二本鎖DNA断片と、該第1のDNA断片の5'末端領域と重複する配列を含む第2の二本鎖DNA断片と、

該第1のDNA断片の3'末端領域と重複する配列を含む第3の二本鎖DNA断片と、

該第2のDNA断片の5'末端領域にアニールするセンスプライマーと、及び該第3のDNA断片の3'末端領域にアニールするアンチセンスプライマーと、を接触させてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により直鎖状二本鎖DNAを増幅する方法において、

該第2のDNA断片が遺伝子の転写及び翻訳を制御する配列を含み、該PCR溶液中における第2のDNA断片及び第3のDNA断片の濃度がそれぞれ、5~2500 pmol/Lであることを特徴とするタンパク質合成用鑄型DNAの製造方法。

【請求項2】

前記第1のDNA断片を調製するために、あらかじめPCR（第1次PCR）を行ってDNAを増幅した後、該第1次PCR溶液を前記第1のDNA断片として用いて請求項1記載のPCR（第2次PCR）を行う方法であって、該第1次PCR溶液中に残存するプライマー及び該第1次PCRで生じたプライマーダイマーの濃度が、該第2次PCR溶液中においてそれぞれ20 nmol/L未満であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記第1次PCRに用いるプライマーの濃度が、それぞれ20~500 nmol/Lであることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記第1次PCR溶液を10～100倍に希釈（第2次PCR溶液中における終濃度で）して前記第2次PCRを行うことを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項5】

前記第1次PCR溶液中からプライマー及びプライマーダイマーを除去することを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項6】

前記第1次PCRの錆型DNAは、組換え微生物菌体又はその培養液であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項7】

前記第2のDNA断片及び／又は第3のDNA断片が、二本鎖DNAに代えて一本鎖DNAであることを特徴とする請求項1～6記載の方法。

【請求項8】

前記センスプライマーとアンチセンスプライマーとが同一の塩基配列であることを特徴とする請求項1～7何れか記載の方法。

【請求項9】

前記第3のDNA断片が、転写終結配列を含むことを特徴とする請求項1～8何れか記載の方法。

【請求項10】

前記第2のDNA断片及び第3のDNA断片の少なくとも一方がタグペプチドをコードする配列を含み、該タグペプチドが前記タンパク質又はその一部と融合して合成されることを特徴とする請求項1～9何れか記載の方法。

【請求項11】

前記タグペプチドはマルトース結合タンパク質、セルロース結合ドメイン、グルタチオンSトランスフェラーゼ、チオレドキシン、ストレプトアビジン結合ペプチド又はヒスチジンタグペプチドであることを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項12】

前記タグペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列からなるヒスチジンタグペプチドであることを特徴とする請求項10記載の方法。

**【請求項 13】**

請求項 1～12 何れか記載の方法により製造した鋳型DNAを用いることを特徴とする無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明はタンパク質を合成するための鋳型DNAの製造方法及びその方法により製造した鋳型DNAを用いてタンパク質を製造する方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

生物の大量のゲノム配列情報から抽出される膨大な数の遺伝子について、それぞれにコードされたタンパク質の立体構造を決定し、機能との相関を系統的かつ網羅的に解析する「構造ゲノム科学」と呼ばれる研究が進展している。ゲノム塩基配列の全体が明らかになるに従って、無数にあると思われたタンパク質の立体構造も、実は千種類から数千種類の基本構造（フォールド）単位の組み合わせから形成されており、この組み合わせによって機能の多様性が実現されているらしいことが分かってきた。従って、タンパク質の合成から構造解析までの全過程をハイスループット化することにより、これらの基本構造の全体を解明し、これらの知識を基にしてタンパク質の構造と機能の関係を明らかにすることはできると考えられる。

**【0003】**

多数のタンパク質試料を効率よく発現、調製するシステムとして、無細胞タンパク質合成系があり、透析法の導入など様々な改良が行われた結果、数時間でミリグラムオーダーのタンパク質が得られるようになってきた（Kigawaら、FEBS Lett.、442巻、15-19頁、1999年、及び特開2000-175695号公報参照）。この無細胞タンパク質合成系でタンパク質を効率よく発現させるためには、鋳型となるDNAとして、適当な発現制御領域と発現させたい所望のタンパク質をコードする遺伝子配列とを含む二本鎖DNAが必要である。適当な発現制御配列を持たないクローニングベクターにクローン化された任意の遺伝子等を無細胞タンパク質合

成系で発現させるためにはこれらの遺伝子に適当な発現制御配列を付加する必要がある。そのために、従来より、遺伝子を含むプラスミドベクター等から制限酵素、PCR等で所望のDNA断片を切り出した後、適当な発現制御配列を持つベクターにリクローニングしたり、更にPCRで所望のDNA断片を増幅する方法が行われてきた。

#### 【0004】

タンパク質の発現効率を上げるためにには、強力なプロモーターやターミネーターを用いて転写を促進すると共に、mRNAとリボソームとの親和性を上げて翻訳効率を高める必要がある。また、合成されたタンパク質を迅速に精製、若しくは検出するためには、アフィニティー精製若しくは検出のための標識（タグ）配列を組み込んだ融合タンパク質を設計することも必要になる。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、このようなタンパク質の合成に適した鋳型DNAを調製する際に、大腸菌等の生細胞を用いて遺伝子組み換えを行いクローン化する方法は、操作が複雑なため時間と手間がかかるだけでなく自動化によるハイスループット化が極めて困難である。また個々の遺伝子ごとに最適化して構築しなければならず、このため複雑な遺伝子組換え操作を行ったり、PCRのためのプライマーを何種類も合成しなければならないという問題があった。

#### 【0006】

そこで、本発明は、タンパク質を発現、精製するための鋳型DNAの効率の良い調製方法を提供することを課題とする。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

上記課題に鑑みて、本発明者らは無細胞タンパク質合成系における鋳型DNAの調製方法について鋭意検討を行った結果、cDNAライブラリーから選択した任意のクローン化DNAを2段階PCRにより増幅することによって、タンパク質の発現に適した直鎖状鋳型DNAが極めて迅速かつ効率よく合成できることを見出し本発明を完成するに到った。

**【0008】**

すなわち、本発明の第1の視点において、  
タンパク質をコードする第1の二本鎖DNA断片と、  
該第1のDNA断片の5'末端領域と重複する配列を含む第2の二本鎖DNA断  
片と、  
該第1のDNA断片の3'末端領域と重複する配列を含む第3の二本鎖DNA断  
片と、  
該第2のDNA断片の5'末端領域にアニールするセンスプライマーと、及び  
該第3のDNA断片の3'末端領域にアニールするアンチセンスプライマーと、  
を接触させてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により直鎖状二本鎖DNAを増  
幅する方法において、  
該第2のDNA断片が遺伝子の転写及び翻訳を制御する配列を含み、  
該PCR溶液中における第2のDNA断片及び第3のDNA断片の濃度がそれ  
ぞれ、5～2500 pmol/Lであることを特徴とするタンパク質合成用鋳型DNAの製  
造方法を提供する。

**【0009】**

好ましい態様において、前記第1のDNA断片を調製するために、あらかじめ  
PCR（第1次PCR）を行ってDNAを増幅した後、該第1次PCR溶液を前  
記第1のDNA断片として用いて上記PCR（第2次PCR）を行う方法であつ  
て、該第1次PCR溶液中に残存するプライマー及び該第1次PCRで生じたプ  
ライマーダイマーの濃度が、該第2次PCR溶液中においてそれぞれ20 nmol/L  
未満であることを特徴とする。

**【0010】**

このように、前記第1次PCRに用いたプライマー及び副産物として生じたプ  
ライマーダイマーの第2次PCRへの持ち込み量を減らすためには、第1次PC  
Rに用いるプライマー濃度を20～500 pmol/Lの範囲内とするか、第1次PC  
R溶液を10～100倍に希釈（第2次PCR溶液中における終濃度で）して第2次  
PCRを行うか、若しくはこれらの両方を組み合わせて行うか、又は第1次PC  
R溶液中からプライマー及びプライマーダイマーを除去した後に第2次PCRを

行うことを特徴とする。

#### 【0011】

また、本発明の一実施形態において、前記第1次PCRの錆型DNAは、組換え微生物菌体又はその培養液であることを特徴とする。

#### 【0012】

さらに好ましい態様において、前記センスプライマーとアンチセンスプライマーが同一の塩基配列であり、及び／又は前記第2のDNA断片は、転写終結配列を含むことを特徴とする。

#### 【0013】

別の好ましい態様において、前記第2のDNA断片及び第3のDNA断片の少なくとも一方がタグペプチドをコードする配列を含み、該タグペプチドが前記タンパク質又はその一部と融合して合成されることを特徴とする。前記タグペプチドはマルトース結合タンパク質、セルロース結合ドメイン、グルタチオンSトランسفエラーゼ、チオレドキシン、ストレプトアビジン結合ペプチド又はヒスチジンタグペプチドであることが好ましい。

#### 【0014】

本発明の別の視点において、上記何れかの方法により製造した錆型DNAを用いることを特徴とする無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質の製造方法を提供する。

#### 【0015】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の一実施形態について添付図面に沿って詳述する。図1は、完全長cDNAをクローニングしたプラスミドDNAを用いて、2段階PCRによって、タンパク質合成用の直鎖状二本鎖錆型DNAを調製する方法を示したフローチャートである。

#### 【0016】

##### (1) 第1次PCR

第1次PCRの錆型DNAは、所望のタンパク質をコードする配列を含むものであればどのようなものでも良く、例えばcDNAライブラリーからクローニング

したものだけでなく、ゲノムDNAクローンや合成DNAを用いることもできる。また、精製されたDNAでなくても良く、例えば、上記配列を含むプラスミドベクターを保持した菌体又はその菌体培養液を用いることができる。図1では、プラスミドベクターpBLUESCRIPT SK+のSacI, XhoI部位にマウス完全長cDNAをクローン化したプラスミドmodified bluescript 1を示す。

#### 【0017】

図1において、クローン化されたcDNAのタンパク質コード領域を増幅するために、5'側のプライマーとして2種類のプライマー（5'-プライマー1及び5'-プライマー2）を使用する。5'-プライマー2の塩基配列は、クローン化したcDNAのコードするタンパク質のアミノ末端領域に相当する塩基配列とアニールするように設計されている。5'-プライマー2は、更にその5'末端側に任意の塩基配列を含むことができる。一方、5'-プライマー1は、上記5'-プライマー2の5'末端側の一部と共に共通の配列を有すれば良く、両方のプライマーが重複して第1次PCRの5'側のプライマーとして機能する。

#### 【0018】

一方、図1において、3'側のプライマーは、タンパク質をコードする領域の3'下流であるプラスミドベクターとアニールするように設計され、上記5'側のプライマーと共にPCRによってDNA鎖を伸長させ、発現させたいタンパク質をコードする第1のDNA断片が増幅される。該第1のDNA断片は、後述する第2次PCRの鋳型として用いるため、PCR反応液から従来公知の方法で精製することができるが、PCR反応液をそのまま用いることもできる。この場合には、反応液中に残存する上記プライマーが第2次PCR反応を阻害する可能性がある。従って、第1次PCRに用いたプライマー及び第1次PCRで副産物として生じたプライマーダイマーの第2次PCR溶液中への持ち込み量を20 nmol/L未満に減らすことが好ましく、具体的には、5'プライマー、3'プライマーのそれぞれについて、複数本のプライマーを用いる場合はその合計濃度で、20～500 nmol/Lの濃度で用いる。更に好ましくは50～100 nmol/Lである。

#### 【0019】

あるいは、第1次PCR溶液を10～100倍に希釈してプライマー及びプラ

イマーダイマーの第2次PCRへの持ち込み量を減らすことができる。

#### 【0020】

なお、このような方法の他に、上記第1のDNA断片を得るために種々のプライマーを用いたPCRが可能であり、その際に用いられるプライマーの塩基配列やPCRの反応条件等は、通常使用されるものであればよく、当業者において適宜設定されることが望ましい。さらに、上記cDNAクローンから直接制限酵素などでDNA断片を切り出すことによって上記第1のDNA断片を取得することもできる。

#### 【0021】

##### (2) 第2次PCR

次に、上記第1のDNA断片の5'末端領域と重複する配列を含む二本鎖の第2のDNA断片（以下、「5' DNA断片」という場合もある。）を調製する。該第2のDNA断片は、その3'末端領域で、上記第1のDNA断片の5'末端領域と重複することによって、これら2つのDNA断片が相互にプライマー及び鋳型となって伸長反応が起こり、第2次PCRにおける鋳型DNAが生成する。重複する領域は、12塩基対以上が好ましく、更に好ましくは17塩基以上である。

#### 【0022】

続いて、上記第1のDNA断片の3'末端領域と重複する配列を含む二本鎖の第3のDNA断片（以下「3' DNA断片」という場合もある。）を調製する。該第3のDNA断片は、その5'末端領域で、上記第1のDNA断片の3'末端領域と重複することによって、これら2つのDNA断片が相互にプライマー及び鋳型となって伸長反応が起こり、第2次PCRにおける鋳型DNAが生成する。重複する領域は、12塩基対以上が好ましく、更に好ましくは17塩基以上である。

#### 【0023】

次に、第2次PCR用のプライマーとして、上記5' DNA断片の5'末端領域にアニールするセンスプライマーと、上記3' DNA断片の3'末端領域にアニールするアンチセンスプライマーを合成する。これらのプライマーは、第2次PCRの鋳型DNAとアニールしてDNA伸長反応を起こし、所望のDNA断片が増幅できればよく、上記鋳型DNAの両末端領域とアニールする複数のプライマーを用

いることができるが、好ましくは図1に示したように、上記両末端配列が相補的な塩基配列である場合には、1種類のプライマー（ユニバーサルプライマー）で増幅反応が可能である。該プライマーは、通常、5～50塩基の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、好ましくは15～25塩基の一本鎖オリゴヌクレオチドからなる。2種類のプライマーを用いるよりも1種類のユニバーサルプライマーを用いる方がPCRによる副産物が少ない点で有利である。

#### 【0024】

一般に、PCRではプライマー同士が対合した副産物（プライマーダイマー）が生じることが知られている。2種類のプライマーを用いた場合には、一旦生じたプライマーダイマーが鋳型DNAとして働いてこの副産物が増幅されてしまい、目的産物の増幅に使用されるプライマー量が減ってしまう。その結果目的産物量が少なくなると考えられる。一方、1種類のプライマーのみを用いてPCRを行った場合は、生じたプライマーダイマーは同一分子内に相補的配列を有するためヘアピン構造をとりやすく、PCRにより増幅されにくいため副産物が少なくなると考えられる。

#### 【0025】

また、上記5' DNA断片は、第1のDNA断片と重複する領域の上流に、遺伝子の転写及び翻訳を誘導、制御する配列を含む。遺伝子の転写を誘導、制御する配列はプロモーター及びオペレーター配列と呼ばれ、大腸菌や酵母等の原核及び真核生物において詳細に研究されている。例えば、大腸菌のファージに由来するT7プロモーター等が使用される。T7プロモーターはT7 RNAポリメラーゼによって強力な転写が行われることが知られている。mRNAのタンパク質への翻訳は、リボゾーム等の翻訳開始複合体がmRNAに結合することによって誘導される。リボゾーム結合配列(RBS)は、SD配列とも呼ばれタンパク質の効率的な発現にとって重要である。

#### 【0026】

さらに、これらの発現制御配列の上流には、PCRにおいて上記センスプライマーがアニールする配列を含む。ここでセンスプライマーの塩基配列は5' DNA断片の5'末端領域とハイブリダイズしてプライマーとして働くものであれば良く

、鑄型DNAと相補的な配列中の1又は数個の塩基が欠失、置換又は付加されたものを含む。

### 【0027】

同様に、3' DNA断片の3'末端領域には、PCRにおいて上記アンチセンスプライマーがアニールする配列を含む。アンチセンスプライマーは、3' DNA断片の3'末端領域とハイブリダイズしてプライマーとして働くものであれば良く、鑄型DNAと相補的な配列中の1又は数個の塩基が欠失、置換又は付加されたものを含む。

### 【0028】

第2次PCRの反応液中における5' DNA断片及び3' DNA断片の濃度は、通常のPCRにおけるプライマーダNA濃度よりも低濃度にすることが好ましく、5～2500 pmol/L、より好ましくは10～500 pmol/Lの濃度で用いられる。これらのDNA断片の濃度が2500 pmol/Lよりも高いとPCR中に副産物が生じやすい。すなわち、5' DNA断片及び3' DNA断片に結合したユニバーサルプライマーから生成される一本鎖DNA同士が上述したプライマーダイマーと同様の仕組みで結合し、その結果5' DNA断片と3' DNA断片とが直接結合したような副産物ができやすい。この副産物は目的産物よりも短いためPCRで増幅されやすく、また、タンパク質合成においても短いタンパク質のみを発現する鑄型として働くため目的とするタンパク質の合成に悪影響を与えるからである。

### 【0029】

一方、DNA断片の濃度が5 pmol/Lよりも低いと、鑄型として働くDNAの量そのものが少なくなつて十分な量の目的DNAが増幅されない。第2次PCRのその他の反応条件については、当業者において適宜反応条件を選択して用いることができる。

### 【0030】

上記5' DNA断片は、さらに転写終結配列を含むことが好ましい。転写終結配列は、RNAポリメラーゼの脱離を促すDNA塩基配列であつて、一般にGCに富んだ対称性を示す配列と、それに続くTの連続する特徴的な構造を有し、転写反応を効率化する。

### 【0031】

なお、上記の5' DNA断片及び3' DNA断片の何れか一方又は両方が二本鎖DNAの代わりに一本鎖DNAであっても上記第2次PCRを行うことができ、このような態様も本発明の範囲に含まれる。

### 【0032】

#### (3) タグペプチド

上記5' DNA断片及び3' DNA断片の少なくとも一方に、タグペプチドをコードする配列を含むことが好ましい。タグペプチドとは、発現させるタンパク質のN末端及び／又はC末端に付加されたアミノ酸配列であって、該タンパク質をアフィニティー精製したり、ウエスタンブロッティング検出する場合の手がかりとなる配列である。例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオレドキシン(TrxA)、セルロース結合ドメイン(CBD)、ストレプトアビジン結合ペプチド(例えば、Streptag<sup>TM</sup>)、及びヒスチジンタグ等が挙げられる。

### 【0033】

グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)は、可溶性の酵素タンパク質であって、この遺伝子配列の下流にフレームを合わせて目的遺伝子を組み込むとGSTとの融合タンパク質として発現させることができる。このための組換えベクターpGEX Vectorsはアマシャムファルマシアバイオテック社から市販されている。GSTのタンパク質部分を特異的に認識する抗体や、グルタチオンと結合する性質を利用してアフィニティー精製や酵素免疫染色に利用されている。

### 【0034】

マルトース結合タンパク質(MBP)は、大腸菌のマルトース結合タンパク質であり、MBPとの融合タンパク質はアミロースやアガロースゲルに吸着させた後、過剰のマルトースで遊離して精製できる。また、抗MBP抗体を使用することもできる。

### 【0035】

チオレドキシン(TrxA)は、酸化還元反応を触媒する大腸菌のタンパク質であり、機能性の一対のチオール基によって金属キレートアフィニティークロマトグラ

фи́ーで精製できる。このための担体として、例えばThioBond<sup>TM</sup> Resin(Invitor ogen社製)等が市販されている。

#### 【0036】

セルロース結合ドメイン(CBD)はClostridium cellulovoransとCellulomonas fimi由来のセルロース結合ドメイン配列で、セルロースに特異的に結合する性質を有し、セルロースやキチンなどの不活性な担体に化学的な修飾を行うことなく固定させることができる。

#### 【0037】

ストレプトアビジン結合ペプチドとして、例えばStrep-tagIIと呼ばれる8個のアミノ酸からなるペプチドが知られており、StrepTactin<sup>TM</sup>やStreptavidine<sup>TM</sup>に選択的に結合させて精製することができる。

#### 【0038】

ヒスチジンタグは、連続した又は近傍に配された少なくとも6個のヒスチジンを含むペプチドが好ましい。このヒスチジンタグに直接又はアミノ酸配列を介して上記第1のDNA断片によってコードされるタンパク質が結合される。ヒスチジンタグは、二価の金属原子、特にニッケル原子と親和性が高い。そのためヒスチジンタグを有するタンパク質はニッケルアフィニティーマトリックスにしっかりと結合し、容易に精製することができる。

#### 【0039】

特に好ましい形態において、上記ヒスチジンタグは配列番号1で示したアミノ酸配列を有する。この配列は、トリ筋肉の乳酸脱水素酵素のN末端に由来する天然の配列(native His tag)である。塩基性アミノ酸である6個のヒスチジン残基が適度に分散して存在するため、連続する6個のヒスチジンタグよりも等電点が低く、中性の緩衝液条件でアフィニティー精製ができるという利点を有する。

#### 【0040】

本形態において、これらのタグペプチドは発現させたタンパク質をアフィニティー精製したり、検出のために有用なだけでなく、天然型のタンパク質に比べてタグペプチドとの融合タンパク質の方が発現量の増大する場合がある。その理由は明らかではないが、翻訳開始段階においてmRNAやリボソーム等との複合体

を安定化して翻訳効率を高めるためではないかと推測される。

#### 【0041】

これらのタグ配列の下流には、トロンビン、Factor Xa、エンテロキナーゼ等のプロテアーゼ切断部位ができるような塩基配列を含んでいても良く、目的タンパク質を上記タグ配列から切り離して精製することもできる。

#### 【0042】

また、上記タグ配列は目的タンパク質のC末端側に配し、N末端側のリーダー配列の機能を残したまま、精製も容易に行えるようにすることもできる。

#### 【0043】

##### (4) 無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質の合成

このようにして製造した鋳型DNAは、種々の方法によりタンパク質を合成することができる。例えば、無細胞タンパク質合成系によりタンパク質を合成することが好ましい。無細胞タンパク質合成系は、細胞抽出液を用いて試験管内でタンパク質を合成する系であり、上記細胞抽出液としては、リボゾーム、t-RNA等のタンパク質合成に必要な成分を含む、従来より公知の真核細胞又は原核細胞の抽出液が使用可能である。好ましくは小麦胚芽や大腸菌由来のもの（例えば大腸菌S30細胞抽出液）又は高度好熱菌(*Thermus thermophilus*)由来のものが高い合成量を得る点において好ましい。この大腸菌S30細胞抽出液は、大腸菌A19 (rna. met) , BL21, BL21 star, BL21 codon plus株等から公知の方法 (Pratt, J. M. et al., *Transcription and translation - a practical approach*, (1984), pp. 179-209, Henes, B.D. と Higgins, S.J. 編、IRL Press, Oxford参照) に従って調製でき、又はPromega社、Novagen社又はRoche社から市販されるものを使用してもよい。

#### 【0044】

本発明の無細胞タンパク質合成系には、バッチ法、フロー法の他、従来公知の技術がいずれも適用可能であり、例えば限外濾過膜法や透析膜法、樹脂に翻訳鋳型を固定化したカラムクロマト法等 (Spirin, A. ら、Meth. In Enzymol. 217巻、123～142頁、1993年参照) を挙げることができる

#### 【0045】

なお、上記無細胞タンパク質合成系の他にも、例えば動物細胞にリポフェクション等で鑄型DNAを導入して遺伝子を発現させ、生細胞中での、その遺伝子産物の機能解析に利用することも可能である。

#### 【0046】

##### 【実施例】

以下に本発明の実施例として、ヒト c-Ha-Rasタンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、及びマウス完全長cDNAライブラリーから任意に選択した種々のcDNAクローン(理化学研究所ゲノム科学総合研究センター、遺伝子構造・機能研究グループ、林崎良英博士から提供を受けた。)を無細胞タンパク質合成系で発現させた結果を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0047】

##### [実施例1] Rasタンパク質の発現

###### (1) 第1次PCR

Rasタンパク質をコードする直鎖状二本鎖DNA(配列番号2に塩基配列を示した。)を鑄型とし、5'プライマー1:hRBS>B+6(配列番号3)、5'プライマー2:pRas(配列番号4)及び3'プライマー:p8.2(配列番号5)の3種類のプライマーを用いてPCRを行った。PCR溶液組成、及び増幅プログラムは、それぞれ表1及び表2に示した。

#### 【0048】

5'プライマー1:hRBS>B+6(配列番号3)

5'-CCGAAGGAGCCCCACCAT- 3'

5'プライマー2:pRas(配列番号4)

5'-GAAGGAGCCGCCACCATGACCGAATACAAACTGGTTGTAG- 3'

3'プライマー:p8.2(配列番号5)

5'-GCGGATAACAATTTCACACAGGAAAC- 3'

#### 【0049】

【表1】

| 組成  | 濃度             | 添加量          | 終濃度                |
|---|----------------|--------------|--------------------|
| 錫型プラスミド                                       | 1ng/ $\mu$ l   | 4 $\mu$ l    | 0.2ng/ $\mu$ l     |
| 5'プライマー1(hRBS>B+6)                            | 1.6 $\mu$ M    | 1 $\mu$ l    | 0.08 $\mu$ M       |
| 5'プライマー2                                      | 0.2 $\mu$ M    | 2 $\mu$ l    | 0.02 $\mu$ M       |
| 3'プライマー(pS.2)                                 | 2 $\mu$ M      | 1 $\mu$ l    | 0.1 $\mu$ M        |
| dNTPs(東洋紡)                                    | 2 mM           | 2 $\mu$ l    | 0.2 mM             |
| Expand HF緩衝液(ベーリンガーマンハイム)<br>(15mM塩化マグネシウム含有) | (10x)          | 2 $\mu$ l    | (1x)               |
| 滅菌蒸留水   |                | 7.85 $\mu$ l |                    |
| DNAポリメラーゼ(ベーリンガーマンハイム)                        | 3.5 U/ $\mu$ l | 0.15 $\mu$ l | 0.02625 U/ $\mu$ l |
| 合計量   |                | 20 $\mu$ l   |                    |

【0050】

【表2】

|        |                     |                   |
|--------|---------------------|-------------------|
| STEP1  | 94°C                | 2 min             |
| STEP2  | 94°C                | 30 sec            |
| STEP3  | 60°C                | 30 sec            |
| STEP4  | 72°C                | 2min              |
| STEP5  | GOTO 2 for 9 times  |                   |
| STEP6  | 94°C                | 30 sec            |
| STEP7  | 60°C                | 30 sec            |
| STEP8  | 72°C                | 2 min +5sec/cycle |
| STEP9  | GOTO 6 for 19 times |                   |
| STEP10 | 72°C                | 7 min             |
| STEP11 | 4°C                 | forever           |

【0051】

## (2) 第2次PCR

次に、上記反応によって得られた第1次PCR産物と、T7プロモーター配列の下流に各種のタグ配列を有する5' DNA断片:T7P(配列番号6~10)と、T7ターミネーター配列を有する3' DNA断片:T7T(配列番号11)と、ユニバーサルプライマー(YA1.2):5'-GCCGCTGTCCTCGTTCCCAGCC-3'(配列番号12)とを用い第2次オーバーラップPCRを行った。PCR溶液組成、及びプログ

ラムは、それぞれ表3及び表2に示した。また、ここで用いた5' DNA断片にコードされたタグペプチドの概要を表4に示した。この結果、図1に示したように、T7プロモーターの制御下で、各種のタグ配列とRasタンパク質との融合タンパク質を発現することができる直鎖状二本鎖DNA断片を増幅した。

## 【0052】

【表3】

| 組成   | 濃度       | 添加量     | 終濃度         |
|--|----------|---------|-------------|
| 第1次PCR産物(錆型)                                   | (x1/5)   | 5 μl    | (x1/20)     |
| ユニバーサルプライマー(YA1.2)                             | 100 μM   | 0.2 μl  | 1 μM        |
| 5' 断片(T7P fragment)                            | 2nM      | 1 μl    | 0.1nM       |
| 3' 断片(T7T fragment)                            | 2nM      | 1 μl    | 0.1nM       |
| dNTPs (東洋紡)                                    | 2mM      | 2 μl    | 0.2mM       |
| Expand HF緩衝液(ベーリンガーマンハイム)<br>(15mM 塩化マグネシウム含有) | (10x)    | 2 μl    | (1x)        |
| 滅菌蒸留水  |          | 8.65 μl |             |
| DNAポリメラーゼ(ベーリンガーマンハイム)                         | 3.5 U/μl | 0.15 μl | 0.02625U/μl |
| 合計量  |          | 20 μl   |             |

## 【0053】

【表4】

|   |                |                    |
|---|----------------|--------------------|
| 1 | GST            | グルタチオンSトランスフェラーゼ   |
| 2 | MBP            | マルトース結合タンパク質       |
| 3 | TrxA           | チオレドキシン            |
| 4 | CBD            | セルロース結合ドメイン        |
| 5 | His tag        | MKGSSHHHHH         |
| 6 | native His tag | MKDHLIHNVHKEEHAHAK |

なお、His tag及びnative His tagについては、それらのアミノ酸配列を一文字の略号で表した。

## 【0054】

## (3) 無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質の合成

大腸菌S30抽出液はZubayら(Annu. Rev. Genet., 7, 267-287, 1973)の方法に従って、大腸菌BL21株から調製した。タンパク質合成反応は96ウエルマイクロプレート法にて実施した。

レートを用い、その各ウエルに下記の表5に示した組成の溶液に、上記第2次P C R産物1μl、上記大腸菌S30抽出液7.2μlを加え、反応液の全量を30μlとし、37°Cで1時間、Rasタンパク質の合成を行った。

### 【0055】

【表5】

| 組成                             | 濃度            |
|--------------------------------|---------------|
| HEPES-KOH pH7.5                | 58.0 mM       |
| ジチオスレイトール                      | 2.3 mM        |
| ATP                            | 1.2 mM        |
| CTP, GTP, UTP                  | 各 0.9 mM      |
| クレアチニンリン酸                      | 81.0 mM       |
| クレアチニキナーゼ                      | 250.0 μg/ml   |
| ポリエチレングリコール8000                | 4.0%          |
| 3',5'-cAMP                     | 0.64 mM       |
| L(-)-5-フォルミル-5,6,7,8,-テトラヒドロ葉酸 | 35.0 μg/ml    |
| 大腸菌トータルtRNA                    | 170.0 μg/ml   |
| グルタミン酸カリウム                     | 200.0 mM      |
| 酢酸アンモニウム                       | 27.7 mM       |
| 酢酸マグネシウム                       | 10.7 mM       |
| アミノ酸                           | 各 1.5 mM      |
| T7RNAポリメラーゼ(東洋紡)               | 16.0 units/μl |

### 【0056】

#### [実施例2] CATタンパク質の発現

##### (1) 第1次P C R

CATタンパク質をコードする配列番号13に示した塩基配列の直鎖状二本鎖DNAを鋳型として、実施例1と同様の方法で第1次P C Rを行った。ただし、5'プライマー2としては、CAT遺伝子に特異的な、配列番号14に示した塩基配列のプライマーpCATを用いた。

### 【0057】

5'プライマー2:pCAT(配列番号14)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGGAGAAAAAAATCACTGGATATA- 3'

### 【0058】

##### (2) 第2次P C R及び無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質の合成

実施例1と同様の方法により、第2次PCR及び無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質の合成を行った。

### 【0059】

#### [実施例3] マウスcDNAクローンの発現

##### (1) 第1次PCR

マウス完全長cDNAライブラリーから任意に選択した10種類のcDNAクローンを鋳型として用いた。これらは、プラスミドpBluescriptSK+のSacI, XhoI部位にそれぞれのcDNAがクローン化されたものであり、GenBankに登録されている(Accession No.は、それぞれm16206、m21532、x13605、u51204、l16904、s68022、d87663、x65627、m32599、u85511である。)。5'プライマー1及び3'プライマーとしては実施例1と共にプライマーを用い、5'プライマー2としてはそれぞれのcDNAに特異的な以下の塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行った。PCR溶液組成、及びプログラムは、それぞれ表6及び表2に示した。

### 【0060】

5'プライマー2:p1A2(配列番号15)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGCTCAAAGTCACGGTGCCC- 3'

5'プライマー2:p1B2(配列番号16)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGGAGGAGCAGCGCTGTT- 3'

5'プライマー2:p1C8(配列番号17)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGGCCCGAACCAAGCAGAC- 3'

5'プライマー2:p1D2(配列番号18)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGGGTGTTGACAAAATCATTCC- 3'

5'プライマー2:p1D9(配列番号19)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGTTGGAGACCTACAGCAACC- 3'

5'プライマー2:p1D10(配列番号20)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGGCGGTGCAGGTGGTGC- 3'

5'プライマー2:p1E4(配列番号21)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGGATGATCGGGAGGATCTG- 3'

5' プライマー 2 : p1G4 (配列番号 2 2)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGTCGAGTTATTCTAGTGAC- 3'

5' プライマー 2 : p1H1 (配列番号 2 3)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC- 3'

5' プライマー 2 : p1H5 (配列番号 2 4)

5' -GAAGGAGCCGCCACCATGCCAACAGTGAGCG- 3'

### 【0061】

【表6】

| 組成  | 濃度             | 添加量          | 終濃度                |
|---|----------------|--------------|--------------------|
| 錆型プラスミド   | 0.2ng/ $\mu$ l | 4 $\mu$ l    | 0.04ng/ $\mu$ l    |
| 5' プライマー 1 (hRBS>B+6)                           | 10 $\mu$ M     | 1 $\mu$ l    | 0.5 $\mu$ M        |
| 5' プライマー 2                                      | 0.1 $\mu$ M    | 1 $\mu$ l    | 0.005 $\mu$ M      |
| 3' プライマー (pS.2)                                 | 10 $\mu$ M     | 1 $\mu$ l    | 0.5 $\mu$ M        |
| dNTPs (東洋紡)                                     | 2 mM           | 2 $\mu$ l    | 0.2 mM             |
| Expand HF 緩衝液(ベーリンガーマンハイム)<br>(15mM 塩化マグネシウム含有) | (10 x)         | 2 $\mu$ l    | (1x)               |
| 滅菌蒸留水   |                | 8.85 $\mu$ l |                    |
| DNA ポリメラーゼ (ベーリンガーマンハイム)                        | 3.5 U/ $\mu$ l | 0.15 $\mu$ l | 0.02625 U/ $\mu$ l |
| 合計量   |                | 20 $\mu$ l   |                    |

### 【0062】

#### (2) 第2次PCR

実施例1と同様の方法により、第2次PCRを行った。但し、PCR溶液組成は表3に代えて表7に示した組成の反応溶液を用いた。

### 【0063】

【表7】

| 組成  | 濃度       | 添加量     | 終濃度         |
|---|----------|---------|-------------|
| 第1次PCR産物(鑄型)                                  | (x1/10)  | 5 μl    | (x1/40)     |
| ユニバーサルプライマー(YA1.2)                            | 100 μM   | 0.2 μl  | 1 μM        |
| 5'断片(T7P fragment)                            | 2nM      | 0.5 μl  | 0.05nM      |
| 3'断片(T7T fragment)                            | 2nM      | 0.5 μl  | 0.05nM      |
| dNTPs (東洋紡)                                   | 2mM      | 2 μl    | 0.2mM       |
| Expand HF緩衝液(ベーリンガーマンハイム)<br>(15mM塩化マグネシウム含有) | (10x)    | 2 μl    | (1x)        |
| 滅菌蒸留水   |          | 9.65 μl |             |
| DNAポリメラーゼ(ベーリンガーマンハイム)                        | 3.5 U/μl | 0.15 μl | 0.02625U/μl |
| 合計量   |          | 20 μl   |             |

## 【0064】

## [実施例4] 合成産物の確認

実施例1及び2の方法によりPCRで増幅した反応液の一部を1%アガロースゲル電気泳動で分析した結果を図2に示した。レーン1～7はそれぞれ、1：第1次PCR産物、2：Hisタグを付加した第2次PCR産物、3：native Hisタグを付加した第2次PCR産物、4：GSTタグを付加した第2次PCR産物、5：MBPタグを付加した第2次PCR産物、6：CBDタグを付加した第2次PCR産物、及び7：TrxAタグを付加した第2次PCR産物を示す。第1次PCR及び第2次PCR共に、単一のDNAのバンドのみが検出され、第2次PCRでは、それぞれの標識ペプチドをコードするタグ配列を結合した正しい長さのDNAが増幅されていることが分かる。

## 【0065】

実施例1及び2の方法により、無細胞タンパク質合成系で合成されたタンパク質量を、<sup>14</sup>C標識Leu存在下で合成後、TOPCOUNTを用いて定量した。その結果を下記表8及び図3に示した。表8は、6種類の標識ペプチドとの融合タンパク質として合成されたRasタンパク質及びCATタンパク質の推定分子量と発現量を示した。対照として、DNA無添加で合成した結果及び環状二本鎖DNAであるプラスミドpk7-Ras及びpk7-CAT(Kigawaら、FEBS Lett.、442巻、15-19頁、1999年、参照)を用いて無細胞タンパク質合成系で合成した結果を示した。これらの結果

より、用いたタグペプチドの種類によって発現量は異なるものの、これらのタグペプチドのない環状二本鎖DNAを鋳型として用いた場合とほぼ同等の発現量が得られることが分かった。

### 【0066】

【表8】

| タグ配列       | R a s        |                | C A T        |                |
|------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
|            | 分子量<br>(kDa) | 発現量<br>(μg/ml) | 分子量<br>(kDa) | 発現量<br>(μg/ml) |
| His tag    | 22.2         | 45.3           | 28.4         | 99.1           |
| native His | 20.7         | 268.9          | 29.5         | 413.7          |
| GST        | 42.6         | 293.8          | 52.8         | 374.9          |
| MBP        | 57.3         | 663.1          | 67.4         | 684.8          |
| CBD        | 37.8         | 467.8          | 44.0         | 493.9          |
| TrxA       | 28.7         | 375.2          | 38.9         | 335.8          |
| DNA 無添加    | —            | 14.1           | —            | —              |
| pk7-Ras    |              | 498.5          | —            | —              |
| pk7-CAT    | —            | —              | 28.6         | 478.4          |

### 【0067】

また、上記<sup>14</sup>C標識Leu存在下でタンパク質合成を行った溶液5μlを用いてSDS-PAGEを行った結果を図4に示した。図4において、レーン1～7はそれぞれ、1：Hisタグを付加したRas又はCATタンパク質、2：native Hisタグを付加したRas又はCATタンパク質、3：GSTタグをRas又はCATタンパク質、4：MBPタグを付加したRas又はCATタンパク質、5：CBDタグを付加したRas又はCATタンパク質、及び6：TrxAタグを付加したRas又はCATタンパク質を示す。なお、図中、Ras及びCATと示したレーンには、対照として、プラスミドpk7-Ras及びpk7-CATを鋳型として無細胞タンパク質合成系で合成したタンパク質を、H、Lはそれぞれ高分子量及び低分子量の分子量マーカーを示す。これらの結果より、それぞれのタグを付加したRas及びCATタンパク質が正しい分子量で合成されていることが分かる。

### 【0068】

実施例3の方法により、GST及びnative His tag配列と融合して合成したマウスcDNAクローン由来のタンパク質の合成量を図5に示した。これらの結果より多検体のcDNAクローンから効率よくタンパク質が合成できることが示され

た。

### 【0069】

#### [比較例1]

第2次PCRに用いた5' DNA断片(T7P(GST)又はT7P(His tag))及び3' DNA断片(T7T)の濃度を変化させて、実施例1及び2と同様の方法により2段階PCRを行った。この他の条件は全て実施例1及び2と同じ条件とした。第2次PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動により調べた結果を表9に示した。

### 【0070】

#### 【表9】

| 試料  | 1 | 2 | 3  | 4   | 5    | 6    | 7     |
|---|---|---|----|-----|------|------|-------|
| 第2次PCR溶液中での<br>T7P 及び T7T の濃度<br>(pmol/L) | 1 | 5 | 50 | 500 | 2500 | 5000 | 10000 |
| アガロースゲル電気泳動による分析結果                        |   |   |    |     |      |      |       |
| Ras + GST tag                             | - | - | ○  | ○   | △    | △    | △     |
| Ras + His tag                             | - | ○ | ○  | ○   | ○    | △    | △     |
| CAT + GST tag                             | - | ○ | ○  | ○   | △    | △    | △     |
| CAT + His tag                             | - | ○ | ○  | ○   | ○    | △    | △     |
| no DNA + GST tag                          | - | - | -  | -   | ×    | ×    | ×     |
| no DNA + His tag                          | - | - | -  | ×   | ×    | ×    | ×     |

### 【0071】

なお、アガロースゲル電気泳動の評価基準は次の通りである。

-：PCR産物なし。

○：正しいPCR産物のみ認められる。

△：正しいPCR産物と副産物の両方が認められる。

×：副産物のみが認められる。

### 【0072】

これらの結果より、第2次PCR溶液中における5' DNA断片及び3' DNA断片の濃度がそれぞれ1 pmol/LではDNAの增幅が起こらず、一方、5000 pmol/L以上では副産物の量が増えて鋳型DNAの純度が低下する。従って、5' DNA断

片及び3' DNA断片濃度がそれぞれ5~2500 pmol/Lの範囲内において効率よく鋳型DNAの増幅が起こることが分かる。

### 【0073】

#### [比較例2]

第1次PCRに用いたプライマー濃度を下記のように変化させて、実施例1及び2と同様の方法により2段階PCRを行った。第2次PCRにおける5' DNA断片としては、T7P(GST)及びT7P(His tag)を用いた。この他の条件は全て実施例1及び2と同じ条件とした。第2次PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動により調べた結果を表10に示した。

### 【0074】

#### 【表10】

| 試料                        | 1   | 2    | 3   | 4   | 5    | 6   | 7    |
|---------------------------|-----|------|-----|-----|------|-----|------|
| 第1次PCR溶液中のプライマー濃度(nmol/L) |     |      |     |     |      |     |      |
| hRBS>B+6 primer           | 5   | 15   | 40  | 80  | 230  | 480 | 980  |
| pRas 又は pCAT              | 5   | 10   | 10  | 20  | 20   | 20  | 20   |
| pS.2 primer               | 10  | 25   | 50  | 100 | 250  | 500 | 1000 |
| 第2次PCR溶液中のプライマー濃度(nmol/L) |     |      |     |     |      |     |      |
| pS.2 primer               | 0.5 | 1.25 | 2.5 | 5   | 12.5 | 25  | 50   |
| アガロースゲル電気泳動による分析結果        |     |      |     |     |      |     |      |
| Ras + GST tag             | -   | -    | ○   | ○   | ○    | ×   | ×    |
| Ras + His tag             | -   | ○    | ○   | ○   | ○    | △   | △    |
| CAT + GST tag             | -   | ○    | ○   | ○   | ○    | ×   | ×    |
| CAT + His tag             | -   | ○    | ○   | ○   | ○    | ○   | △    |
| no DNA + GST tag          | -   | -    | -   | -   | ×    | ×   | ×    |
| no DNA + His tag          | -   | -    | -   | -   | ×    | ×   | ×    |

### 【0075】

なお、アガロースゲル電気泳動の評価基準は次の通りである。

- : PCR産物なし

○ : 正しいPCR産物のみ認められる

△ : 正しいPCR産物と副産物の両方が認められる。

×：副産物のみが認められる

### 【0076】

これらの結果より、Ras及びCAT発現用の錆型DNAの調製において、第1次PCRで用いた3'プライマー:p8.2の第2次PCR溶液中の濃度を指標として、25nmol/L以上の濃度では副産物の量が増えて目的とするDNAの増幅が行われないことが分かる。対照として錆型DNAを用いなかった場合でもプライマーダイマーに相当する副産物のみの増幅が認められた。一方、第1次PCRに用いるプライマー濃度が10 nmol/L以下の場合には、第2次PCRで効率の良いDNAの増幅が認められなかった。

### 【0077】

#### 【発明の効果】

本発明の方法によれば、タンパク質をコードする配列を含むcDNAやゲノムDNAを基に、無細胞タンパク質合成系等によりタンパク質を合成、精製、検出するための錆型DNAを迅速かつ効率よく製造することができる。これにより構造ゲノム科学の研究を目的とするタンパク質の構造と機能解析のための自動化システムの構築が可能となる。

### 【0078】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Methods for producing a linear template DNA and producing a protein in a cell free system using thereof

<130> RJH13-021T

<160> 24

)  
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> native His tag

<400> 1

Met Lys Asp His Leu Ile His Asn Val His Lys Glu Glu His Ala His

1

5

10

15

Ala His Asn Lys

20

<210> 2

<211> 605

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> double stranded linear DNA coding for Ras protein

<400> 2

)

|  |     |
|--|-----|
| ggcgtataca tatgaccgaa tacaaactgg ttgtagttgg cgctggtggt gtaggcaaaa  | 60  |
| gcgcgcgtgac cattcagttg atccagaacc acttcgtaga tgagtacgac ccgactattg | 120 |
| aagactctta ccgtaaggcag gttgttatcg acggtgagac ctgtttgctg gacatcctt  | 180 |
| ataccgcagg ccaagaagaa tactctgcta tgcgtgatca gtatatgcgt accggcgaag  | 240 |
| gcttcctgtg cgtttcgct atcaacaaca ccaaatttt tgaagacatc catcaatacc    | 300 |
| gtgaacagat caaacgtgtt aaagactctg atgacgttcc gatggttctg gttggtaaca  | 360 |
| aatgcgactt ggcagcgcgt actgttgaat ctgcgtcaggc tcaggatctg gctcgttctt | 420 |
| acggaattcc gtacatcgaa acctctgcta aaactcgtca aggcgttgaa gacgcttct   | 480 |
| acaccttggt tcgtgaaatc cgtcagcaca agctgcgtaa gctttgatag aattccgtga  | 540 |
| tagctcgagt cgaccggctg ctaacaaagc ccgaaagggt ttccctgtgt aaattgttat  | 600 |
| ccgct  | 605 |

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-1 universal

<400> 3

|                      |    |
|----------------------|----|
| ccgaaggagc cgccaccat | 19 |
|----------------------|----|

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for Ras

<400> 4

gaaggagccg ccaccatgac cgaatacataaa ctggtttag 40

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' primer universal

<400> 5

gcggataaca attcacaca ggaaac 26

<210> 6

<211> 844

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' DNA fragment comprising GST tag sequence

<400> 6

ccgctgtcct cgttcccaagc ccatgattac gaattcagat ctcgatcccg cgaaattaat 60

acgactcact atagggagac cacaacggtt tccctctaga aataatttg tttaacttta 120

agaaggagat atacatatgt cccctatact aggttattgg aaaattaagg gccttgtgca 180

acccactcga cttctttgg aatatcttga agaaaaatata gaagagcatt tgtatgagcg 240

|  |     |
|--|-----|
| cgtgaaggt gataaatggc gaaacaaaaa gttgaattg gggtggagt ttccaatct      | 300 |
| tccttattat attgatggtg atgttaatt aacacagtct atggccatca tacgttatat   | 360 |
| agctgacaag cacaacatgt tgggtggttg tccaaaagag cgtgcagaga tttcaatgct  | 420 |
| tgaaggagcg gtttggata ttagatacgg tggtcgaga attgcataata gtaaagactt   | 480 |
| tgaaactctc aaagttgatt ttcttagcaa gctacctgaa atgctaaaaa tggtcgaa    | 540 |
| tcgttatgt cataaaacat atttaatgg tgcacatgt acccatcctg acttcatgtt     | 600 |
| gtatgacgct ctgtatgtt tttatacat ggacccaatg tgcctggatg cggtcccaa     | 660 |
| attagttgt tttaaaaaac gtattgaagc tatcccacaa attgataagt acttgaatc    | 720 |
| cagcaagtat atagcatggc cttgcaggg ctggcaagcc acgttgttg gtggcgacca    | 780 |
| tcctccaaaa tcggatagct ctggcgccctc cctggtgcca cgccgatccg aaggagccgc | 840 |
| cacc   | 844 |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 5' DNA fragment comprising His tag sequence

&lt;400&gt; 7

|   |     |
|---|-----|
| ccgctgtcct cgttcccagc ccatgattac gaattcagat ctgcgtcccc cgaaattaat | 60  |
| acgactcact atagggagac cacaacggtt tccctctaga aataattttt ttaacttta  | 120 |
| agaaggagat atacatatga aaggcagcag ccatcatcat catcatcaca gcagcggcgc | 180 |
| ctccctggtg ccacgcggat ccgaaggagc cgccacc                          | 217 |

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 244

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' DNA fragment comprising native His tag sequence

<400> 8

|   |     |
|---|-----|
| ccgctgtcct cgttcccagc ccatgattac gaattcagat ctcgatcccg cgaaattaat | 60  |
| acgactcact atagggagac cacaacggtt tccctctaga aataatttg tttaacttta  | 120 |
| agaaggagat atacatatga aagatcatct catccacaat gtccacaaag aggagcacgc | 180 |
| tcatgcccac aacaagagct ctggcgccctc cctggtgcca cgcgatccg aaggagccgc | 240 |
| cacc  | 244 |

<210> 9

<211> 652

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' DNA fragment comprising CBD

<400> 9

|   |     |
|---|-----|
| ccgctgtcct cgttcccagc ccatgattac gaattcagat ctcgatcccg cgaaattaat | 60  |
| acgactcact atagggagac cacaacggtt tccctctaga aataatttg tttaacttta  | 120 |
| agaaggagat atacatatgt cagttgaatt ttacaactct aacaaatcg cacaacaaa   | 180 |
| ctcaattaca ccaataatca aaattactaa cacatctgac agtGattaa atttaatga   | 240 |
| cgtaaaagtt agatattatt acacaagtga tggcacacaa ggacaaactt tctggtgtga | 300 |
| ccatgctggc gcattattag gaaatagcta tgttgataac actagcaaag tgacagcaa  | 360 |
| cttcgttaaa gaaacagcaa gcccaacatc aacctatgat acatatgtt aattggatt   | 420 |
| tgcaagcgga gcagctactc ttaaaaaagg acaattata actattcaag gaagaataac  | 480 |

aaaatcagac tggtaaaact acactcaaac aaatgactat tcatttgatg caagtagttc 540  
 aacaccagggt gtaaatccaa aagttacagg atatatagggt ggagctaaag ttcttggtag 600  
 agcaagctct ggccctccc tggtgccacg cgatccgaa ggagccgcca cc 652

<210> 10

<211> 511

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' DNA fragment comprising Thioredoxin sequence

<400> 10

ccgctgtcct cgttcccagc ccatgattac gaattcagat ctgcgtcccg cgaaattaat 60  
 acgactcact atagggagac cacaacggtt tccctctaga aataattttg tttaacttta 120  
 agaaggagat atacatatga gcgataaaat tattcacctg actgacgaca gtttgacac 180  
 gatatgtactc aaagcggacg gggcgatcct cgatcgatttc tggcagagt ggtgcgggcc 240  
 gtgc当地atg atcgccccga ttctggatga aatcgctgac gaatatcagg gcaaaactgac 300  
 cgttgcaaaa ctgaacatcg atcaaaaaccc tggcactgacg ccgaaatatg gcatccgtgg 360  
 tatcccgact ctgctgctgt tcaaaaaacgg tgaagtggcg gcaaccaaag tgggtgcact 420  
 gtctaaaggt cagttgaaag agttcctcga cgctaacctg gccagctctg ggcctccct 480  
 ggtgccacgc ggatccgaag gagccgccccac c 511

<210> 11

<211> 183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' DNA fragment comprising T7 terminator

<400> 11

|  |     |
|--|-----|
| gttcctgtg tgaaattgtt atccgctgct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa   | 60  |
| ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gtttttgct gaaaggagga   | 120 |
| actatatccg gataaacctcg agctgcaggc atgcaagctt ggggctggga acgaggacag | 180 |
| cgg  | 183 |

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> universal primer for 2nd PCR

<400> 12

|                          |    |
|--------------------------|----|
| gccgctgtcc tcgttcccag cc | 22 |
|--------------------------|----|

<210> 13

<211> 760

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> double stranded linear DNA coding for CAT protein

<400> 13

|   |    |
|---|----|
| ggcgatataca tatggagaaa aaaatcactg gatataccac cgtttatata tccaatggc | 60 |
|---|----|

}  
atcgtaaaga acatttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg 120  
ttcagctgga tattacggcc ttttaaaga ccgtaaagaa aaataagcac aagtttatac 180  
cggccttat tcacattctt gccgcctga tgaatgctca tccggaattc cgtatggcaa 240  
tcaaagacgg tgagctggtg atatggata gtgttcaccc ttgttacacc gtttccatg 300  
agcaaactga aacgtttca tcgctctgga gtgaatacca cgacgatttc cggcagttc 360  
tacacatata ttgcgaagat gtggcgtgtt acggtaaaaa cctggcctat ttccctaaag 420  
ggtttattga gaatatgttt ttgcgtctag ccaatccctg ggtgagttc accagtttg 480  
attnaacgt ggc当地atg gacaacttct tcgccccgt tttcaccatg ggcaaatatt 540  
atacgcaagg cgacaagggtg ctgatgccgc tggcgattca ggttcatcat gccgtctgt 600  
atggcttcca tgtcggcaga atgcttaatg aattacaaca gtactgcgt gagtggcagg 660  
gcggggcgta atttttaa ggcagttatt ggtgccctta aacgtcgacc ggctgctaacc 720  
aaagcccgaa agggttcct gtgtgaaatt gttatccgct 760

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for CAT

<400> 14

gaaggagccg ccaccatgga gaaaaaaatc actggatata c 41

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for 1A2

<400> 15

gaaggagccg ccaccatgct caaagtacg gtgcc

36

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for 1B2

<400> 16

gaaggagccg ccaccatgga ggagcagcgc tgttc

35

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for 1C8

<400> 17

gaaggagccg ccaccatggc ccgaaccaag cagac

35

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for 1D2

<400> 18

gaaggagccg ccaccatggg tgttgacaaa atcattcc 38

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for 1D9

<400> 19

gaaggagccg ccaccatgtt ggagacctac agcaacc 37

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for 1D10

<400> 20

gaaggagccg ccaccatggc ggtgcagggtg gtgc

34

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for 1E4

<400> 21

gaaggagccg ccaccatgga tgatcgggag gatctg

36

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' primer-2 for 1G4

<400> 22

gaaggagccg ccaccatgtc gagttattct agtgac

36

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 5' primer-2 for 1H1

&lt;400&gt; 23

gaaggagccg ccaccatggc gaagggtcggt gtgaac

36

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 5' primer-2 for 1H5

&lt;400&gt; 24

gaaggagccg ccaccatggc caacagttag cg

32

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

本発明の一実施形態である直鎖状錆型D N Aの調製方法を示した図である。

#### 【図 2】

種々のタグペプチドと融合したRas及びCATタンパク質をコードする錆型D N Aを本発明の方法によりP C R增幅した結果をアガロースゲル電気泳動で分析した結果である。

#### 【図 3】

種々のタグペプチドと融合したRas及びCATタンパク質の合成量を表したグラフである。

**【図4】**

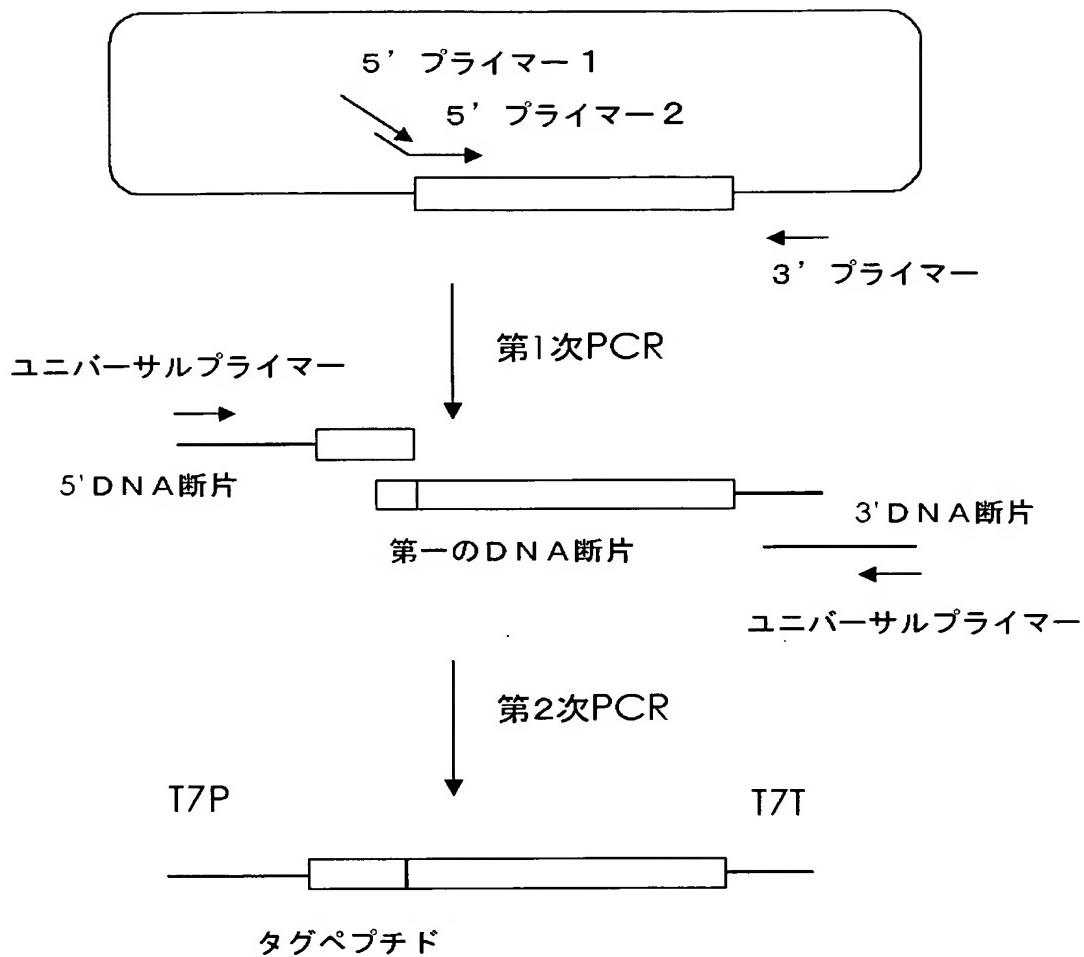
種々のタグペプチドと融合したRas及びCATタンパク質をSDS-PAGEで分析した結果である。

**【図5】**

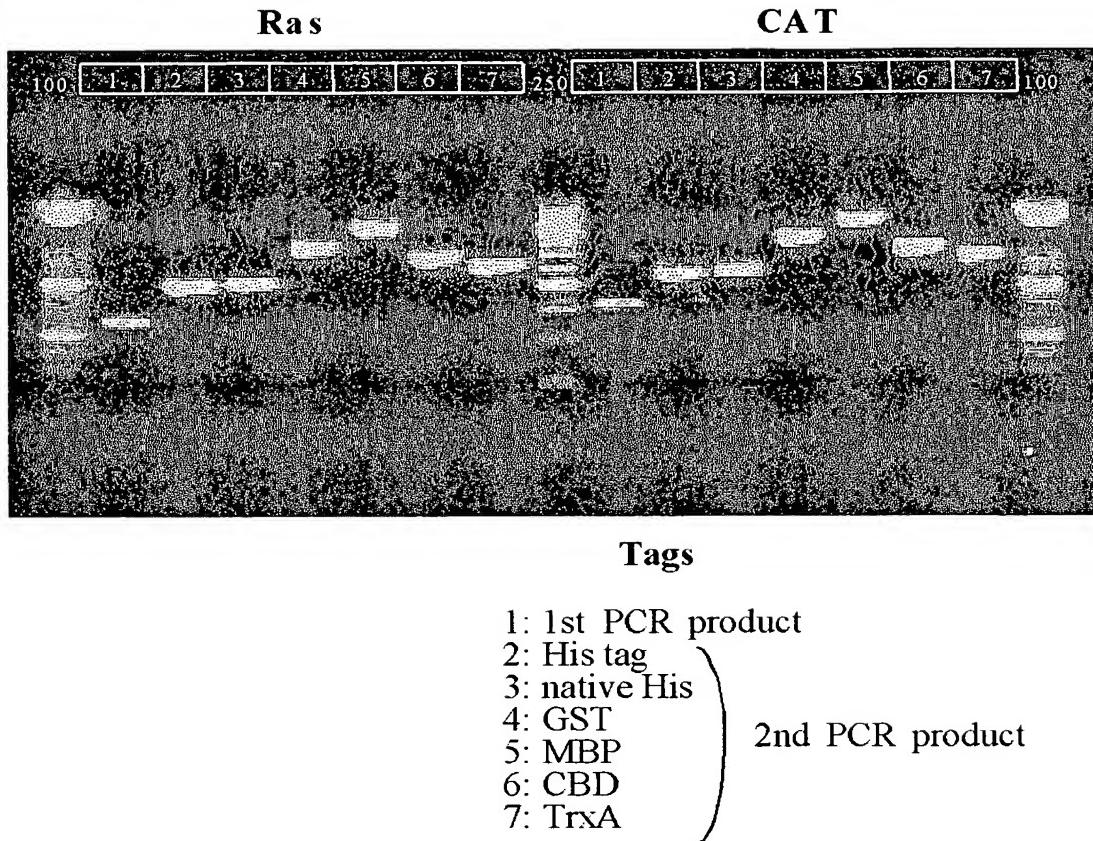
GST及びnative His tag配列と融合して合成したマウスcDNAクローン由來のタンパク質の合成量を表したグラフである。

【書類名】 図面

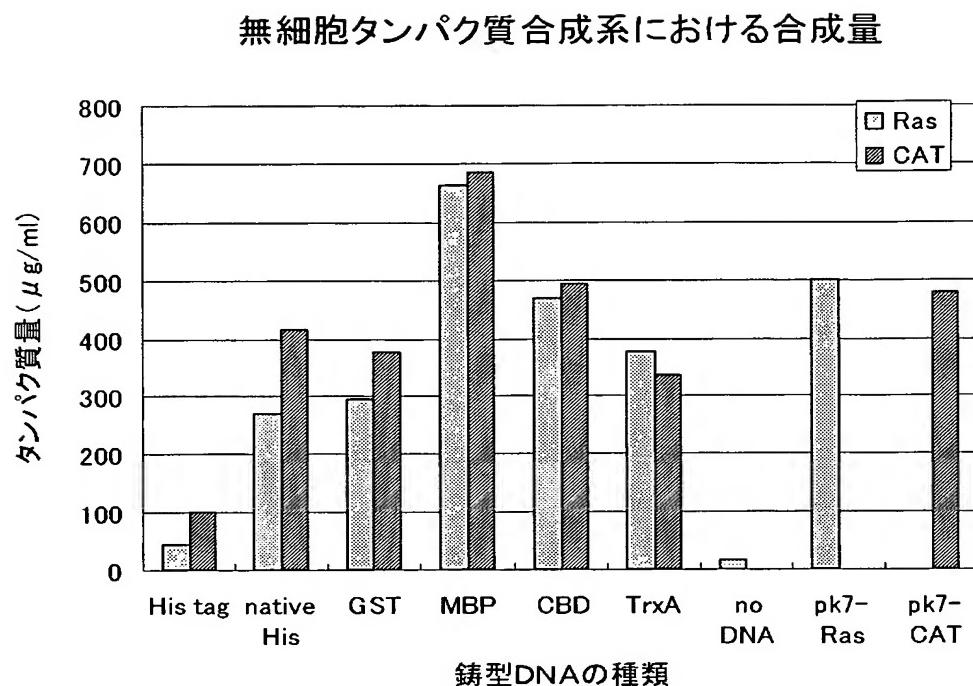
【図1】



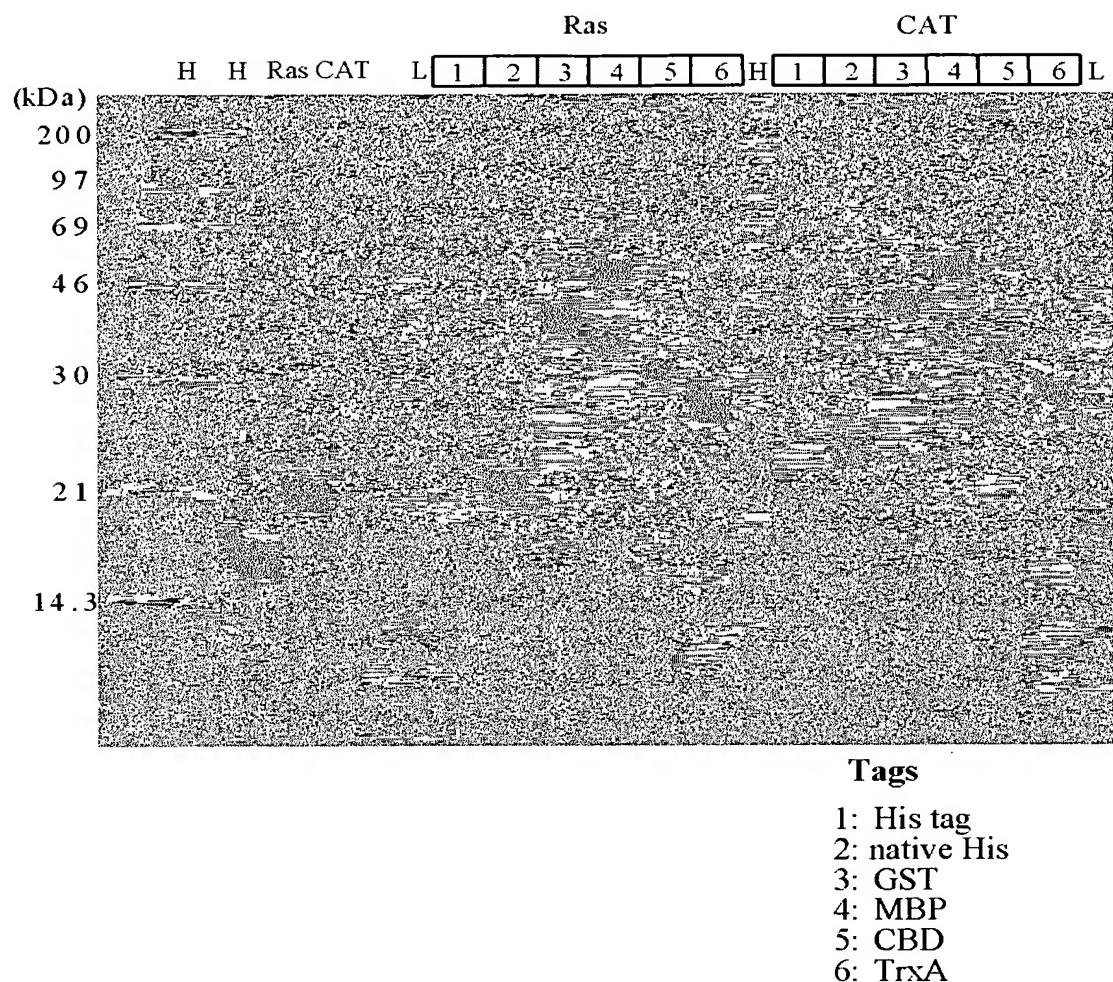
【図2】



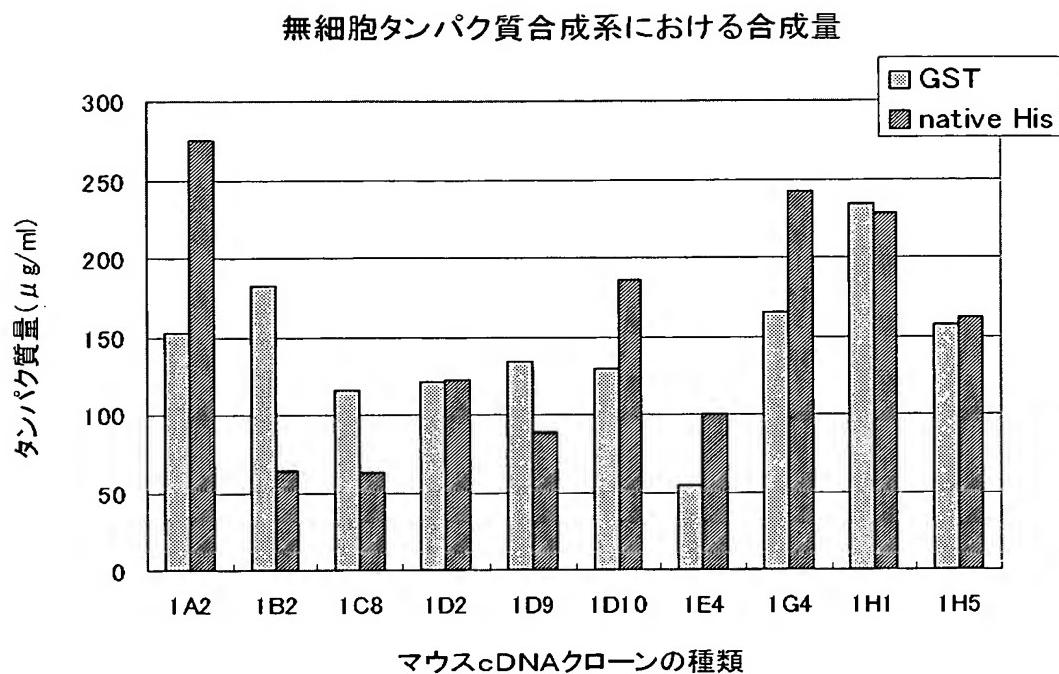
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

タンパク質を発現、精製するための鋳型DNAの効率の良い調製方法を提供すること。

【解決手段】

タンパク質をコードする第1の二本鎖DNA断片と、該第1のDNA断片の5'末端領域と重複する配列を含む第2の二本鎖DNA断片と、該第1のDNA断片の3'末端領域と重複する配列を含む第3の二本鎖DNA断片と、該第2のDNA断片の5'末端領域にアニールするセンスプライマーと、及び該第3のDNA断片の3'末端領域にアニールするアンチセンスプライマーと、を接触させてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により直鎖状二本鎖DNAを増幅する方法において、該第2のDNA断片が遺伝子の転写及び翻訳を制御する配列を含み、該PCR溶液中における第2のDNA断片及び第3のDNA断片の濃度がそれぞれ、5～2500 pmol/Lであることを特徴とするタンパク質合成用鋳型DNAの製造方法を提供する。

【選択図】

図1

特願 2001-201356

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 埼玉県和光市広沢2番1号

氏 名 理化学研究所